肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的体外分离、鉴定及其原代培养吸收模型的构建与评估

张树敏　廖秀冬　吕　林　张丽阳　罗绪刚*

（中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，矿物元素营养研究室，北京 100193）

摘　要：本试验旨在评估十二指肠上皮细胞不同接种密度对细胞紧密连接性及细胞活力的影响，为建立肉鸡鸡胚体外原代培养十二指肠上皮细胞吸收模型选择最佳的细胞接种密度。试验采用单因子完全随机试验设计，共设 3 个组，Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞接种密度分别为 $2.90×10^6$、$6.25×10^6$、$8.75×10^6$ 个/mL，每个组 6 个重复，共培养 4 d。结果表明：1）刚分离的十二指肠上皮细胞团呈球形，且细胞团的大小均一，悬浮于培养液中，贴壁后细胞团开始向外伸展，逐渐铺成片，细胞之间界限清晰、贴壁均匀，呈单层“铺路石样”生长。2）经碱性磷酸酶染色，阳性试验组的十二指肠上皮细胞胞浆被染成了蓝黑色，阴性对照组的十二指肠上皮细胞不着色。3）在细胞培养的 48 和 72 h，Ⅰ组和Ⅱ组细胞的跨膜电阻（TEER）值均满足大于 300 $Ω·cm^2$ 的试验要求，酚红透过率均满足小于 5%的试验要求，并且Ⅰ组细胞的 TEER 值均显著高于Ⅱ组（$P<0.05$），细胞酚红透过率均显著低于Ⅱ组（$P>0.05$）。4）在细胞培养的 24 和 48 h，Ⅰ组细胞培养液中的乳酸脱氢酶（LDH）活力均显著低于Ⅱ组和Ⅲ组（$P<0.05$）。以上结果表明，细胞接种密度为 $2.90×10^6$ 个/mL，培养时间为 48 h 时，细胞间界限清晰、生长状态良好、紧密连接性强，细胞活力最佳，即表明原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞物质吸收模型构建成功，可为后续十二指肠上皮细胞的吸收规律及其分子机制的研究提供了良好的试验模型。

关键词：十二指肠上皮细胞；原代培养；细胞分离；跨膜电阻

中图分类号：S831；S811.3

小肠是动物重要的消化器官，是营养物质主要的消化与吸收的场所。而小肠上皮细胞

收稿日期：2018-02-06
基金项目：国家自然科学基金面上项目（31472116）；国家自然科学基金重点项目（31630073）；国家重点研发计划项目（2017YFD0502200）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目（2016ywf-yb-8）；国家现代农业产业技术体系岗位专家专项经费（CARS-41）；中国农业科学院科技创新工程专项经费（ASTIP-IAS08）
作者简介：张树敏（1992—），女，山东聊城人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: 18205480062@163.com
*通信作者：罗绪刚，研究员，博士生导师，E-mail: wlysz@263.net

（intestinal epithelial cells，IEC）作为体内更新最快的一类细胞，是肠道内外环境的媒介，又是机体免疫屏障的重要组成部分，具有消化、吸收、分泌、免疫等重要的生理功能[1]。小肠上皮细胞在一定条件下可进行体外分离和培养。体外分离培养小肠上皮细胞对于研究肠道生物学功能、营养物质吸收机制及其调控以及小肠上皮细胞增殖和分化提供了简单、快速的手段，并为研究营养素及其他外界因素对肠上皮的作用提供了理想的体外模型[2]。一般而言，体外培养胚胎组织比成体组织更易生存和生长，因而其细胞分离后容易培养成功。而成体组织中大部分是非繁殖的分化细胞，当细胞分化时生长受到严重抑制或完全停止，并且成体组织的年龄越大，体外培养的成功率越低，这可能与胚胎干细胞的分化水平有关，故成体来源组织培养细胞增殖极为困难，且培养周期缩短[3]。李艳等[4]选取9胚龄鸡胚，Guo等[5]选取17胚龄鸡胚，马玉龙等[6]和古少鹏等[7]选取18胚龄鸡胚，Derache等[8]选用大于18胚龄的将出壳鸡胚，贾国东等[9]选取20胚龄鸡胚进行小肠上皮细胞原代培养，均已成功构建小肠上皮细胞体外原代培养模型。以上文献中选取的鸡胚多集中在18胚龄左右，故本试验选用18胚龄鸡胚十二指肠上皮细胞进行原代培养。但是关于原代培养肠上皮细胞用于物质吸收试验未见报道，有诸多研究用Caco-2细胞进行培养作为物质吸收模型[10-13]，并进行其单层模型细胞紧密连接性的评估[14-15]。本实验室前期Liu等[16]用半体内半体外的原位结扎灌注肠段法研究发现，磷在肉鸡原位结扎灌注肠段中的主要吸收肠段是十二指肠，胡义信[17]用自然饲喂法进一步深入研究证实磷在肉鸡自然饲喂过程中的主要吸收肠段是十二指肠，与Liu等[16]研究结果一致。在以上2个试验的基础上，用体外原代培养十二指肠上皮细胞的方法，可进一步证实磷在肉鸡鸡胚原代培养十二指肠上皮细胞中的转运吸收规律及其分子机制。因此，本研究采用Caco-2细胞评估其单层模型细胞连接紧密性的方法，来评估十二指肠上皮细胞不同接种密度在不同培养时间下对细胞连接紧密性及细胞活力的影响，为建立肉鸡鸡胚体外原代培养十二指肠上皮细胞吸收模型选择最佳的细胞接种密度，并最终构建十二指肠上皮细胞原代培养的物质吸收模型。

1　材料与方法

1.1　试验设计

试验采用单因子完全随机试验设计，共设 3 个组，Ⅰ组、Ⅱ组、Ⅲ组十二指肠上皮细胞接种密度分别为 2.90×10^6、6.25×10^6、8.75×10^6 个/mL，每个组 6 个重复，每个重复包含 2

个培养孔。

1.2 试验动物

18 胚龄的爱拔益加（AA）肉鸡鸡胚，由河北滦平华都肉鸡公司提供。

1.3 主要试剂和仪器

主要试剂：杜氏磷酸盐缓冲液（D-PBS）、DMEM/F12 培养基、胎牛血清、台盼蓝、胶原酶I，购于 Gibco 公司；青-链霉素、肝素钠，购于 Sigma 公司；表皮细胞生长因子、噻唑蓝（MTT）试剂盒，购于上海凡歌生物化工公司；5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐/四唑硝基蓝（BCIP/NBT）碱性磷酸酯酶显色试剂盒，购于碧云天生物技术研究所；链霉亲和素-生物素复合物（SABC）免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺（DAB）显色试剂盒、4%多聚甲醛，购于武汉博士德生物工程有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）测定试剂盒，购于南京建成生物工程研究所；细胞角蛋白 18 抗体，购于博奥森公司；胰岛素，购于迈晨科技(北京)有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器：150、500 目细胞过滤筛（北京索莱宝科技有限公司），超纯水净化装置（Milli-Q，美国 Biocell 公司），自动灭菌锅（TOMY SS-325），台式离心机（Eppendorf），0.22 μm 滤器（美国 Millipore 公司），CO_2 培养箱（美国 Thermo 公司），相差倒置显微镜（日本 Olympus 公司），超净工作台（YJ-1450 型医用净化工作台，苏州长桥净化设备厂），Millicell-ERS 电阻仪（美国 Millipore 公司），50 mL 离心管、60 mm 细胞培养皿、6 孔细胞培养板、96 孔细胞培养板（美国 Corning 公司），全波长酶标仪（美国 Biotek 公司）。

1.4 AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的消化、分离

参考 Guo 等[5]和 Qin 等[18]的消化分离细胞的方法，取 18 胚龄 AA 肉鸡鸡胚，用 75%酒精擦其外壳，晾干后在无菌条件下取出十二指肠，用解剖器械取出肠组织，置于盛有预冷的含 2%青-链霉素的 D-PBS 中，用镊子剔除十二指肠中夹带的胰脏及其筋膜，用含 2%青-链霉素的 D-PBS 反复清洗 2~3 次。用剪刀将十二指肠组织剪成 0.5 cm 长的小段，转移至盛有 30 mL DMEM/F12 培养基的 50 mL 离心管中，剧烈振荡数次，将清洗液吸出，重复 2~3 次。然后将肠段剪成小于 1 mm^3 的组织块碎片，静置数分钟自行沉淀，用 DMEM/F12 肠段清洗液冲洗 3~4 次至上清液澄清，吸弃洗液。

向沉淀中加入 10 倍体积的 1 mg/mL 胶原酶I消化液消化，在 37 ℃水浴箱中慢速（80 循

环/min）振荡消化 50 min，消化完毕后，于 1 000×*g* 离心 8 min，弃上清去除酶消化液。继续向沉淀中加入 10 mL DMEM/F12 肠段清洗液悬浮沉淀，轻轻吹打混匀，于 1 000×g 离心 8 min，弃上清，重复该洗涤操作 1~2 次。加入 10 mL DMEM/F12 贴壁培养液悬浮沉淀，反复轻柔吹打 5~10 次，用 150 和 500 目的细胞筛连续过滤悬液以去除组织块和成纤维细胞，留在 500 目筛上的细胞团用 DMEM/F12 贴壁培养液冲洗下来，制成细胞悬液，用台盼蓝染色法进行十二指肠上皮细胞活细胞率的检测。

1.5　AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞活细胞率的检测

用彭彬等[19]使用的台盼蓝染色法进行十二指肠上皮细胞活细胞率检测。主要步骤为：取 200 μL 细胞悬液，加入等量 0.4%的台盼蓝溶液，混匀后取 1 滴于细胞计数板上，轻轻盖上盖玻片，于相差倒置显微镜下观察。分别计数未染色的细胞数（活细胞）和染色的细胞数（死细胞）。活细胞率计算：

活细胞率（%）=100×活细胞数/（活细胞数+死细胞数）。

当活细胞率达到 95%以上时，可用于以下的十二指肠上皮细胞培养。

1.6　AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的培养

采用 DMEM/F12 培养基作为基础培养基，另外添加胎牛血清浓度为 3%，用制成的 DMEM/F12 贴壁培养液将获得的十二指肠上皮细胞团进行悬浮，制成细胞悬液，当活细胞率达到 95%以上且按照以上试验设计调整细胞密度，随即取 1.5 mL 细胞悬液接种于 Transwell 6 孔细胞培养板的上槽中，另取没有细胞的 DMEM/F12 培养基 2.6 mL 于 Transwell 6 孔细胞培养板的下槽中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，共培养 4 d。

1.7　AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞碱性磷酸酶染色鉴定

采用洪智敏等[2]的方法进行鸡胚十二指肠上皮细胞碱性磷酸酶染色鉴定。原代培养的十二指肠上皮细胞贴壁生长 48 h 后，选取已接种培养细胞的 1 块 6 孔细胞培养板，吸出 6 个培养孔中培养液并以磷酸盐缓冲液（PBS）清洗 2 次，洗去未贴壁细胞及碎片杂质，并加入 4%多聚甲醛固定液固定 30 min。随后以 PBS 洗涤 2 次去除固定液，即可用于鉴定。其中 3 个培养孔作为阳性试验组，3 个培养孔作为阴性对照组。具体操作步骤按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒说明进行。

1.8　样品采集与制备

在细胞培养的第 24、48、72、96 h，立即收集培养孔上槽中细胞培养液 0.5 mL 于灭菌的 1.5 mL 离心管中，将 2 个培养孔的细胞培养液收集合为 1 个重复，共收集 6 个重复，于 3 500 r/min、4 ℃条件下离心 10 min，取上清置于-20 ℃冰箱中保存，以备测定细胞培养液中 LDH 活力；随即弃去 Transwell 6 孔细胞培养板上、下槽中剩余细胞培养液，用含酚红培养基和无酚红培养基测定细胞酚红透过率，细胞样品收集于灭菌的 1.5 mL 离心管中，置于-20 ℃冰箱中保存以备测定其酚红透过率；用 Millcell-ERS 电阻仪测量每个培养孔的跨膜电阻（transepithelial electrical resistance,TEER）值。连续测定收集 4 d。

1.9　样品分析

分别于细胞培养的第 24、48、72、96 h，取上、下槽培养液 0.5 mL 于具塞试管中，分别加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL 显色，摇匀后以 1 mol/L NaOH 溶液为空白，在 560 nm 下测定吸光度（OD）。按以下公式计算细胞酚红透过率：

酚红透过率（%）=100×$OD_{下层}$ /（$OD_{上层}$+$OD_{下层}$）。

细胞生长孔 TEER 值计算：

TEER 值（Ω·cm^2）=（细胞生长孔值-空白孔值）×微孔面积。

式中：微孔面积为 Transwell 6 孔细胞培养板插入槽的面积，为 4.67 cm^2。

将每天收集的 6 个重复的细胞培养液解冻，参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书步骤进行 LDH 活力测定。

1.10　数据统计分析

用 SAS 9.0[20]软件中一般线性模型（general linear model,GLM）程序对所得数据进行单因素方差分析，以每个重复分析样本作为 1 个试验单元。方差分析差异显著者，以最小显著差数法（least significant difference,LSD）比较平均值间的差异显著性。以 $P < 0.05$ 作为数据差异显著性检验标准。

2　结　果

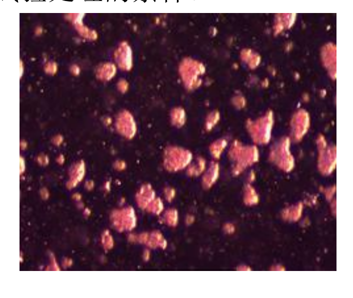
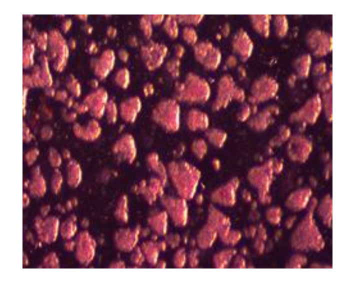
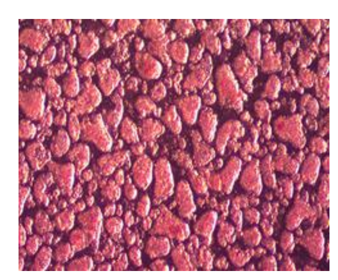
2.1　体外原代培养 AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞分离观察结果

镜下观察发现，可获得大量的十二指肠上皮细胞团和极少量的单个肠上皮细胞，刚分离的十二指肠上皮细胞团呈球形，且细胞团的大小均一，悬浮于培养液中（图 1-A）。I 组细胞团之间空隙较大，II 组细胞团之间仍有较多空隙，III组细胞团之间的空隙明显变小，经台

盼蓝染色鉴定，3 个组细胞活率均在 95%以上，以上结果表明，此次分离获得的十二指肠上皮细胞适用于原代细胞培养模型的构建。

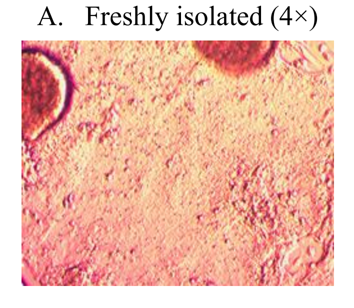
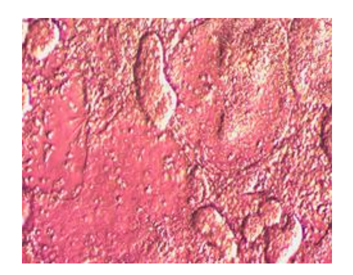
2.2　体外原代培养 AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞形态学观察结果

在倒置生物显微镜下每隔 24 h 观察各处理细胞生长状态、形态特征。在细胞培养的 24 h，十二指肠上皮细胞团沉于培养板底部，已经开始贴壁，贴壁的细胞团开始向外伸展，逐渐铺成片；Ⅰ组的细胞团贴壁伸展较好，贴壁后的细胞表面较为平整；Ⅱ组仍可见部分未完全伸展开的细胞团；Ⅲ组可见大量未伸展开的细胞团（图 1-B）。在细胞培养的 48 h，Ⅰ组和Ⅱ组的已贴壁细胞之间界限清晰，排列紧密，细胞呈单层分布，多呈卵石状、椭圆状，排列紧密，细胞呈"铺路石样"生长；Ⅲ组细胞间界限模糊，有较多未贴壁的死亡细胞团依附在上面（图 1-C）。在细胞培养的 72 h，Ⅰ组和Ⅱ组的细胞界限依然较为清晰，排列紧密，细胞呈单层分布，依然可见"铺路石样"生长的细胞；Ⅲ组细胞模糊不清，细胞脱落明显（图 1-D）。在细胞培养的 96 h，3 个组的细胞都开始有部分脱落，细胞形状开始变得模糊不清，此时细胞基本上不再增殖；Ⅰ组和Ⅱ组已贴壁的十二指肠上皮细胞之间界限变得模糊不清，开始有部分脱落；Ⅲ组细胞脱落后留下许多空泡，细胞脱落明显（图 1-E）。以上结果表明，Ⅰ组和Ⅱ组细胞在培养的 48 和 72 h，细胞之间界限清晰、生长状态良好、贴壁均匀，具备了做试验处理的条件。

A.　刚分离

A.　Freshly isolated (4×)

B.　培养 24 h

B. Cultivated 24 h (10×)

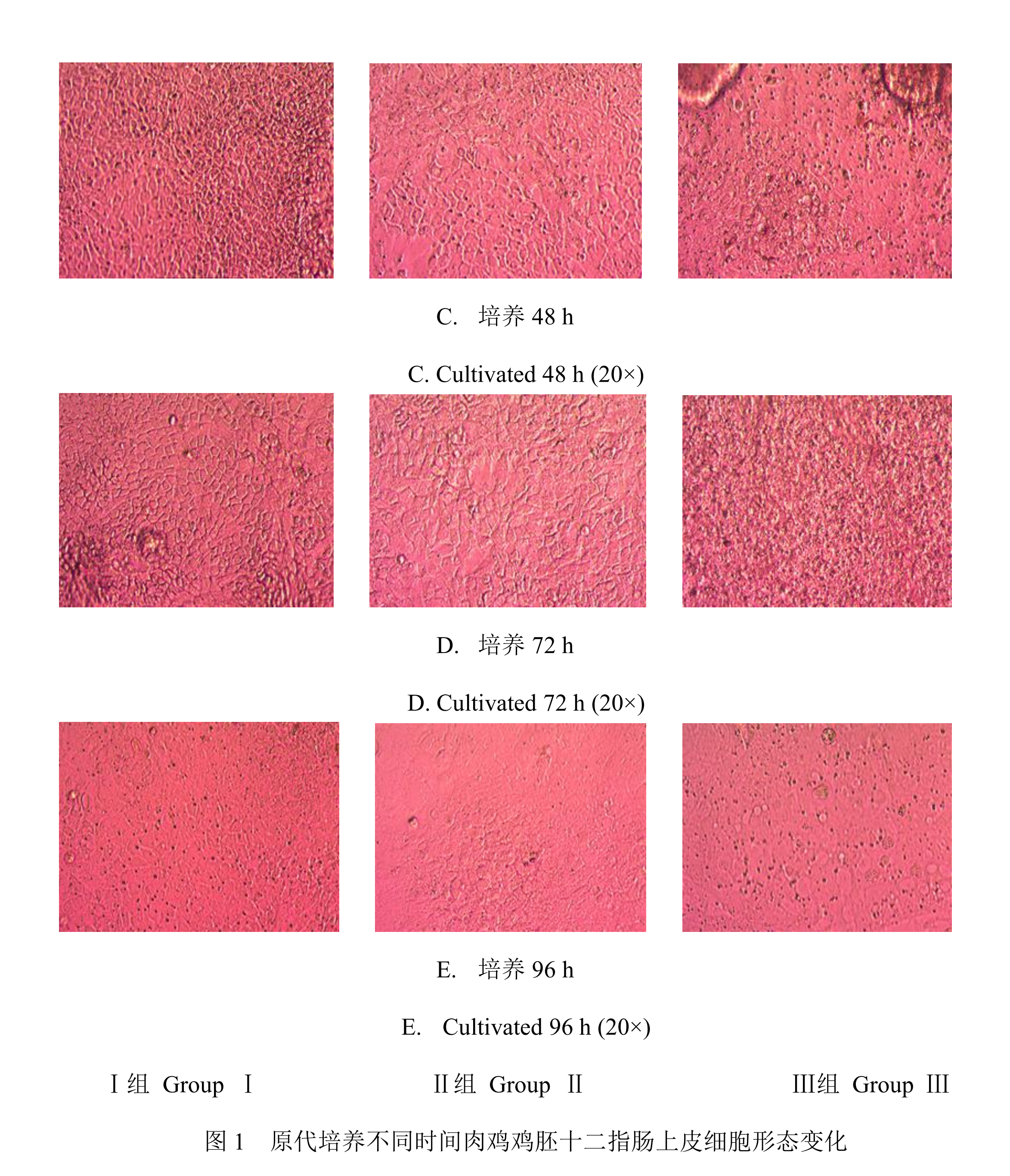
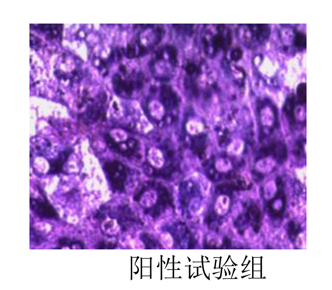


图 1 原代培养不同时间肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞形态变化

Fig.1 Morphological change of primary cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos under different cultivated times

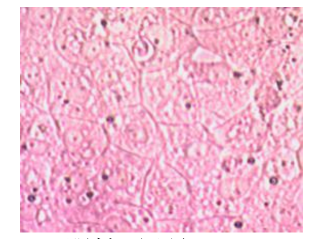
2.3 AA 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞碱性磷酸酶染色鉴定结果

在原代培养的十二指肠上皮细胞贴壁生长 48 h，以Ⅰ组的细胞为例，采用洪智敏等[2]的方法进行十二指肠上皮细胞碱性磷酸酶染色鉴定。结果见图 2，阳性试验组的十二指肠上皮细胞胞浆被染成了蓝黑色（染色率在 95%以上），成纤维细胞或血细胞等杂细胞不着色，另外阴性对照组的十二指肠上皮细胞未被染色。以上结果表明，本试验所获得的细胞是分化完全、功能健全的十二指肠上皮细胞。



阳性试验组

Positive experimental group (40×)



阴性对照组

Negative control group (40×)

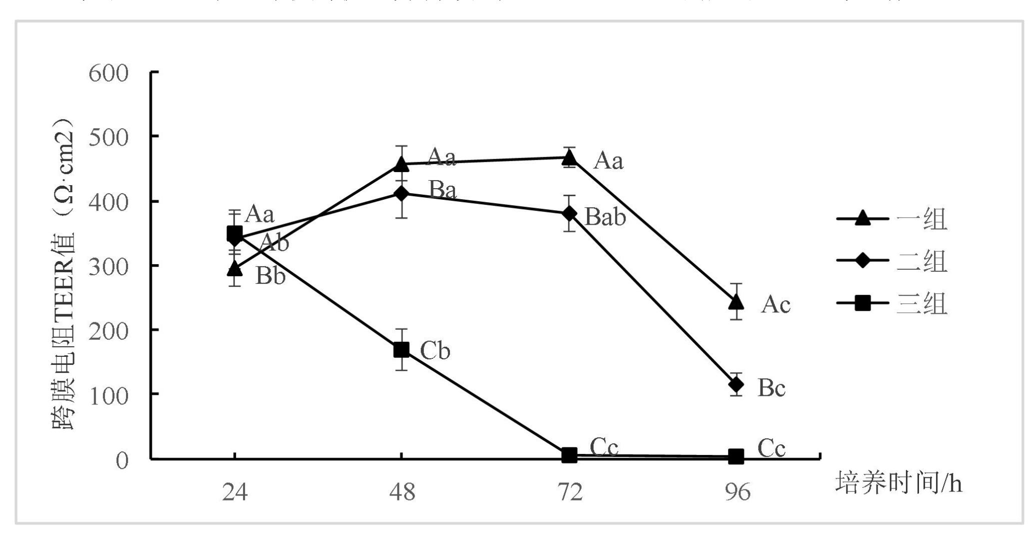
图 2 原代培养 48 h 肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞碱性磷酸酶染色情况

Fig.2 Alkaline phosphatase staining of primary cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos after 48 h cultivations

2.4 十二指肠上皮细胞 TEER 值测定结果

在细胞培养的 24、48、72、96 h，对已贴壁的十二指肠上皮细胞测定其 TEER 值，见图 3。从相同细胞密度不同培养时间角度看，3 个组细胞的 TEER 值均随着细胞培养时间的变化有显著差异（$P<0.05$），Ⅰ组和Ⅱ组细胞的 TEER 值的变化趋势相似，Ⅰ组细胞的 TEER 值在细胞培养的 48 和 72 h 均显著高于 24 和 96 h（$P<0.05$），并且在 48 和 72 h，细胞的 TEER 值维持恒定不变（$P>0.05$）；Ⅱ组细胞的 TEER 值在细胞培养的 48 h 显著高于 24 和 96 h（$P<0.05$）；Ⅲ组细胞的 TEER 值在细胞培养的 24 h 时最高，在 48、72 和 96 h 均显著降低（$P<0.05$）。

从相同培养时间不同细胞密度角度看，在细胞培养的 24 h，Ⅰ组细胞的 TEER 值显著低于Ⅱ组和Ⅲ组（$P<0.05$）；在细胞培养的 48、72 和 96 h，Ⅰ组细胞的 TEER 值显著高于Ⅱ组（$P<0.05$），Ⅱ组细胞的 TEER 值显著高于Ⅲ组（$P<0.005$）。从数值上看，Ⅰ组和Ⅱ组细胞的 TEER 值在 48 h 均达到最高状态并持续到 72 h，且Ⅰ组细胞的 TEER 值均大于Ⅱ组。



数据点不同小写字母表示相同细胞密度不同培养时间之间差异显著（P<0.05），不同大写字母表示相同培养时间不同细胞密度之间差异显著（P<0.05）。下表同。

Value datapoints with different small letters mean significant difference in the same cell density at different culture times (P<0.05), and with different capital letters mean significant difference at the same culture time in different cell density (P<0.05). The same as below.

图 3　原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的 TEER 值

Fig.3　TEER values of primary cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos (n=6)

2.5　十二指肠上皮细胞酚红透过率测定结果

在细胞培养的 24、48、72、96 h，对已贴壁的十二指肠上皮细胞测定其酚红透过率，见图 4。从相同细胞密度不同培养时间角度看，Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组细胞的酚红透过率均随着细胞培养时间的变化有显著差异（P<0.05），Ⅰ组和Ⅱ组细胞的酚红透过率的变化趋势相似，在细胞培养的24、48和72 h，细胞的酚红透过率随细胞培养时间的推移而显著降低（P<0.05），在细胞培养的 96 h，细胞的酚红透过率显著增加（P<0.05）；Ⅲ组细胞的酚红透过率在细胞培养的 24 和 48 h 时均较低，在细胞培养的 72 和 96 h 均显著增高（P<0.05）。

从相同培养时间不同细胞密度角度看，在细胞培养的 48、72 和 96 h，Ⅰ组和Ⅱ组的细胞酚红透过率均显著低于Ⅲ组（P<0.05）。

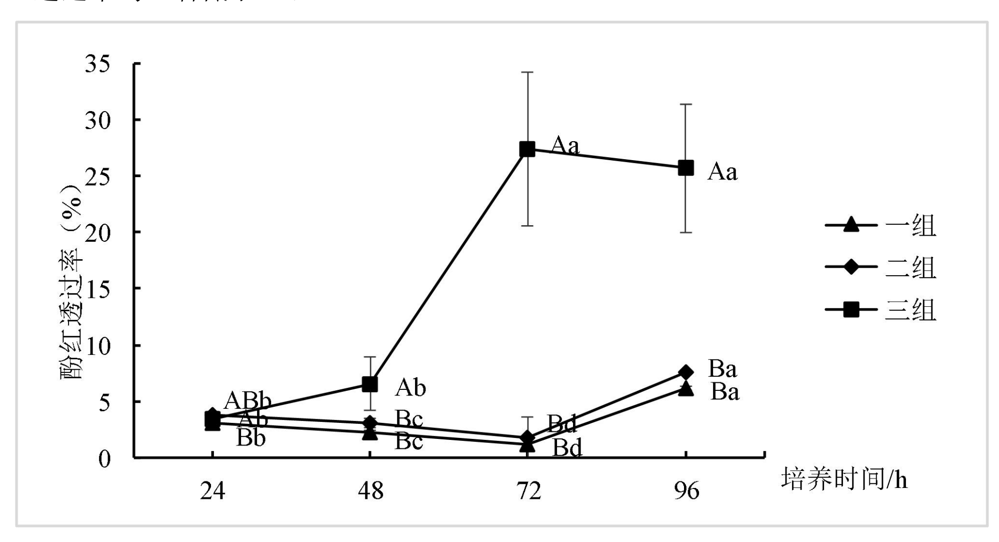


图 4　原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的酚红透过率

Fig.4　Phenol red transmittance of primary cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos (n=6)

2.6　十二指肠上皮细胞培养液中 LDH 活力测定结果

在细胞培养的 24、48、72、96 h，测定细胞培养液中的 LDH 活力，见图 5。从相同细胞密度不同培养时间角度看，Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组细胞培养液中的 LDH 活力均随着细胞培养时间的变化有显著差异（$P<0.05$），Ⅰ组细胞培养液中的 LDH 活力在细胞培养的 24、48 和 72 h 没有显著变化（$P>0.05$），在细胞培养的 96 h 显著增加（$P<0.05$）；Ⅱ组细胞培养液中的 LDH 活力在细胞培养的 24、48 h 均在较低水平，在细胞培养的 72、96 h 显著增高（$P<0.05$）；Ⅲ组细胞培养液中的 LDH 活力在细胞培养的 24、48 和 72 h 随细胞培养时间的推移而显著增高（$P<0.05$），在细胞培养的 96 h 显著降低（$P<0.05$）。

从相同培养时间不同细胞密度角度看，Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组细胞培养液中的 LDH 活力在 24、48、72 h 均有显著差异（$P<0.05$），在细胞培养的 24 和 48 h，Ⅰ组细胞培养液中的 LDH 活力显著低于Ⅱ组（$P<0.05$），Ⅱ组细胞培养液中的 LDH 活力显著低于Ⅲ组（$P<0.05$）；在细胞培养的 72 h，Ⅰ组细胞培养液中的 LDH 活力显著低于Ⅲ组（$P<0.05$），Ⅲ组细胞培养液中的 LDH 活力显著低于Ⅱ组（$P<0.05$）；在细胞培养的 96 h，Ⅰ组和Ⅱ组细胞培养液中的 LDH 活力均显著高于Ⅲ组（$P<0.05$）。从数值上看，Ⅰ组细胞培养液中的 LDH 活力在细胞培养的 24、48、72 h 均维持在较低的水平，在细胞培养的 96 h 开始明显升高。

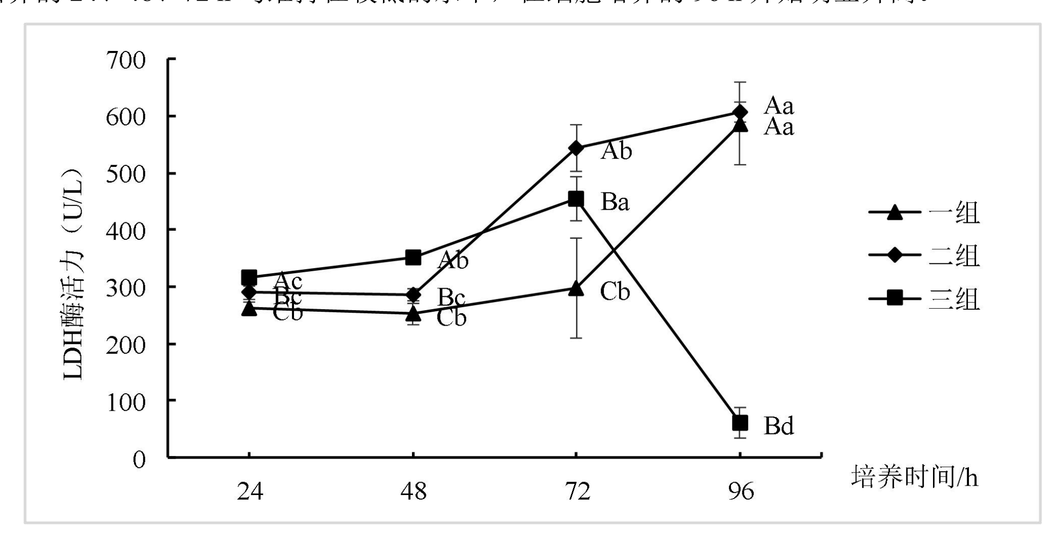


图 5　原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞培养液中的 LDH 活力

Fig.5　LDH activity of primary cultured duodenal epithelial cells medium of broiler embryos (n=6)

3　讨　论

常用的细胞纯化的方法主要有差速贴壁法、机械刮除法和用细胞筛筛选等方法。差速贴壁法主要利用成纤维细胞比肠道上皮细胞贴壁速度快的特点，大部分成纤维细胞能在短时间

内（1~2 h）完成附着过程，而大部分肠上皮细胞在短时间内不能附着或附着不稳定，稍加振荡即浮起，此时收集未贴壁的含大量肠上皮细胞团的细胞悬液，重新接种于新的培养板中，利用此差别可以纯化细胞，从而获得较多的肠上皮细胞团。许多研究利用差速贴壁法去除成纤维细胞等杂细胞，从而获得肠上皮细胞团[4-5,9]。但用这种方法进行操作，会损失掉一部分已贴壁的肠上皮细胞团，使细胞悬液中肠上皮细胞团的密度降低，且成纤维细胞无法去除干净。在原代培养时，上皮细胞和成纤维细胞往往会分区成片混杂生长，每种细胞都以小片或成区域的分布方式生长在瓶壁上，采用机械刮除的方法去除不需要的成纤维细胞区域而保留需要的上皮细胞区域，用这种方法往往容易造成污染、细胞在培养孔孔底分布不均匀等情况。用 150~500 目的细胞筛连续过滤细胞悬液，先用 150 目细胞筛来筛除未被消化的较大组织块，然后用 500 目筛筛除直径较小的血细胞、成纤维细胞和单个肠上皮细胞，而直径相对较大的肠上皮细胞团无法经过 500 目筛，留在 500 目筛上的细胞团用细胞培养液冲洗下来，制成细胞悬液，接种于培养板中就可进行细胞培养[21-22]。用这种方法可以很有效地去除大量成纤维细胞和难以贴壁增殖的单个肠上皮细胞，最终留在细胞悬液中大部分为肠上皮细胞团。本研究采用了 150~500 目细胞筛连续过滤的方法进行去除成纤维细胞，获得大量十二指肠上皮细胞团，并经形态学观察及碱性磷酸酶染色鉴定，很少有成纤维细胞、血细胞等杂细胞污染，细胞纯化较为彻底。

目前，鉴定小肠上皮细胞的常用方法有形态学鉴定、碱性磷酸酶染色法、免疫细胞化学法等[23-25]。本试验的十二指肠上皮细胞增殖迅速，在培养的 2~3 d 数量显著增多，形成集落，呈单层“铺路石样”生长，边界清晰，互不重叠，多呈扁平多角状、卵石状、椭圆状，符合原代培养肠上皮细胞的形态特征。然而，仅凭在显微镜下观察具有肠上皮细胞特征的细胞不能确定为小肠上皮细胞，只能确定为类肠上皮细胞，还需要进一步鉴定。碱性磷酸酶是小肠上皮细胞微绒毛上的标志性酶[2,24]，该酶凝集于肠细胞表面，参与细胞内消化及上皮细胞脱落到肠腔内的细胞外消化过程，能被成功染色的细胞即为十二指肠上皮细胞。洪智敏等[2]、杨文平等[26]和贾国东等[9]均采用碱性磷酸酶染色鉴定法成功鉴定十二指肠上皮细胞。

Caco-2 细胞单层的紧密连接性一般用细胞 TEER 值和标志物的表观通透系数来评价。其中 TEER 值测定是目前公认的一种简单而权威性的评价方法，细胞层的紧密连接与 TEER 值具有密切相关，当 TEER 值增长到一定水平（通常为大于 300 $\Omega\cdot cm^2$）后即表明细胞单层

的紧密连接性好[27]。TEER 值越大，说明细胞紧密连接越强[28-31]。酚红为水溶性小分子物质，不易被肠黏膜代谢且不会通过细胞膜转运，可以间接反映单层细胞之间连接处的通透量，作为细胞单层连接紧密性的标示物。因此，本试验采用酚红作为探针评价在 Transwell 6 孔细胞培养板的插槽内培养的十二指肠上皮细胞间连接的紧密性，酚红透过率小于 5%作为细胞单层形成的标志[30]。在本试验中细胞培养的 24、48 和 72 h，Ⅰ组和Ⅱ组细胞的 TEER 值均满足大于 300 Ω·cm^2 的试验要求，酚红透过率均满足小于 5%的试验要求，并且 2 组细胞的 TEER 值在 48 h 均达到最高状态并持续到 72 h，另外，Ⅰ组细胞的 TEER 值均大于Ⅱ组，细胞酚红透过率均小于Ⅱ组，说明Ⅰ组已贴壁的十二指肠上皮细胞间紧密连接性更强。由此可见，细胞 TEER 值、酚红透过率也可以作为评估原代培养十二指肠上皮细胞紧密连接性的指标。

LDH 是机体细胞内一种稳定存在的酶，当细胞膜受到损害时，它就会通过细胞膜从细胞内漏出到细胞外，因此，细胞培养液中 LDH 活力的高低在一定程度上上反映了细胞的损伤程度[32-34]。Qin 等[18]通过测定原代培养心肌细胞培养液中的 LDH 活力，来作为判断热应激心肌细胞损伤的标志。所以，本试验通过测定十二指肠上皮细胞培养液中 LDH 活力来间接反映十二指肠上皮细胞膜的完整性及细胞活力。本试验中Ⅰ组细胞培养液中的 LDH 活力在细胞培养的 24、48、72 h 均维持在较低的水平，在细胞培养的 96 h 开始显著升高，而其他 2 组细胞培养液中的 LDH 活力在 72 h 就已经明显升高，表明Ⅰ组已贴壁的十二指肠上皮细胞在细胞培养的 24、48 和 72 h 生长状态最好、活力最佳。

4 结 论

综合以上细胞形态学、TEER 值、酚红透过率、细胞培养液中的 LDH 活力 4 项指标得出，在细胞培养的 48 h，2.90×10^6 个/mL 细胞密度组细胞生长状态良好，细胞之间界限清晰、紧密连接性强，细胞活力最佳，因此，原代培养肉鸡鸡胚十二指肠上皮细胞的物质吸收模型构建成功，并且该组细胞所用的接种密度（2.90×10^6 个/mL）可以作为后续十二指肠上皮细胞的吸收规律及其分子机制的研究试验中所用的细胞接种密度。

参考文献：

[1] OSWALD I P.Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine[J].Veterinary Research,2006,37(3):359–368.

[2] 洪智敏,贾永杰,瞿明仁,等.鸡胚小肠上皮细胞的分离及原代培养研究[J].江西农业大学学报,2011,33(6):1164–1170.

[3] 张卓然.培养细胞学与细胞培养技术[M].上海:上海科学技术出版社,2004:10–11.

[4] 李艳,彭春燕,梁榕旺,等.鸡小肠上皮细胞的分离培养与鉴定[J].中国畜牧兽医,2011,38(2):68–72.

[5] GUO S,LI C,LIU D,et al.Inflammatory responses to a *Clostridium perfringens* type A strain and α-toxin in primary intestinal epithelial cells of chicken embryos[J].Avian Pathology,2015,44(2):81–91.

[6] 马玉龙,许梓荣,郭彤,等.鸡肠上皮细胞的分离及原代培养方法[J].中国兽医学报,2007,27(1):74–76,80.

[7] 古少鹏,王敏霞,赵素芬,等.鸡胚盲肠上皮细胞体外培养纯化方法的研究[J].山西农业大学学报（自然科学版）,2011,31(4):369–372.

[8] DERACHE C,ESNAULT E,BONSERGENT C,et al.Differential modulation of β-defensin gene expression by Salmonella Enteritidis in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken inbred lines[J].Developmental & Comparative Immunology,2009,33(9):959–966.

[9] 贾国东,赵毅博,刘冠群,等.鸡肠上皮细胞原代培养方法的改进研究[J].中国家禽,2012,34(19):25–28,32.

[10] 蒋学华,贾运涛,袁媛,等.Caco-2 细胞模型在口服药物吸收过程研究中的应用[J].中国药学杂志,2002,37(5):325–327.

[11] 卢智玲,冯怡,徐德生,等.Caco-2 细胞模型在中药口服吸收及机制研究中的应用[J].中草药,2006,37(4):616–619.

[12] LI X L,XIE J J,LU L,et al.Kinetics of manganese transport and gene expressions of manganese transport carriers in Caco-2 cell monolayers[J].Biometals,2013,26(6):941–953.

[13] 唐家明,吕林,张丽阳,等.不同接种密度对 Caco-2 细胞吸收模型分化及去极化评价指标的影响[J].河北科技师范学院学报,2016,30(3):66–70.

[14] 孙旭,罗余萍.Caco-2 细胞单层模型的建立及其评估[J].药品评价,2015,12(14):33–35,39.

[15] 许玲芬,张雪娇,林楠,等.Caco-2 建立肠黏膜屏障模型及其在通透性研究中的应用[J].国际儿科学杂志,2016,43(3):239–243.

[16] LIU S B,LI S F,LU L,et al.Estimation of standardized phosphorus retention for corn,soybean meal and corn-soybean meal diet in broilers[J].Poultry Science,2012,91(8):1879–1885.

[17] 胡义信.饲粮非植酸磷水平对肉仔鸡小肠磷吸收及其相关磷转运载体基因表达的影响[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2016.

[18] QIN S Z,LIAO X D,LU L,et al.Manganese enhances the expression of the manganese superoxide dismutase in cultured primary chick embryonic myocardial cells[J].Journal of Integrative Agriculture,2017,16(9):2038–2046.

[19] 彭彬,吴晶晶,李烨,等.贴壁培养细胞台盼蓝拒染试验的方法学探讨[J].激光生物学报,2011,20(2):269–273.

[20] SAS Institute Inc.SAS/user's guide:statistics.Version 9.0[M].Cary,N.C.:SAS Institute Inc.,2003.

[21] 杨立,任琛琛,李玛俊,等.体外诱导人羊膜间充质细胞向子宫内膜上皮细胞分化的初步研究[C]//2015 年河南省妇产科学学术年会论文集.郑州:河南省医学会,河南省医师协会,2015.

[22] 武子涛,范如英,李世荣,等.两种肠道脱落细胞收集方法的比较[C]//第四届中国肿瘤学术大会暨第五届海峡两岸肿瘤学术会议论文集.天津:中国抗癌协会,2006.

[23] 詹康,左晓昕,贡笑笑,等.鸡胚小肠上皮细胞的体外分离培养和鉴定[J].动物营养学报,2015,27(7):2150–2156.

[24] 王雪云,刘芳,蒋大伟,等.鸡肠上皮细胞原代培养与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2015(21):10–12.

[25] PERREAULT N,BEAULIEU J F.Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures[J].Experimental Cell Research,1996,224(2):354–364.

[26] 杨文平,高峰,许辉堂,等.鸡肠上皮细胞体外原代培养研究[J].江西农业学报,2007,19(5):113–115,118.

[27] INCECAYIR T,TSUME Y,AMIDON G L.Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat,mouse,and Caco-2 cells:use as a reference standard for BCS classification[J].Molecular Pharmaceutics,2013,10(3):958–966.

[28] 毛小琴,贾雄飞.Caco-2 细胞单层模型的建立和评估[J].四川医学,2013,34(1):7–10.

[29] 孙敏捷,盛星,胡一桥.Caco-2 细胞单层模型的建立与验证[J].中国药学杂志,2006,41(18):1431–1434.

[30] 贾晓燕,赵秀丽,魏敏吉.Caco-2 细胞不同接种密度的模型评价[J].中国医药导刊,2010,12(2):289–290.

[31] MOHRMANN I,MOHRMANN M,BIBER J,et al.Sodium-dependent transport of Pi by an established intestinal epithelial cell line (CaCo-2)[J].American Journal of Physiology,1986,250(3Pt1):G323–G330.

[32] 宋学立,钱令嘉,李凤芝.热应激对乳鼠心肌细胞损伤作用的研究[J].中国应用生理学杂志,2000,16(3):227–230.

[33] CHENG Y B,WANG Y J,ZHANG S C,et al.Response of porcine hepatocytes in primary culture to plasma from severe viral hepatitis patients[J].World Journal of Gastroenterology,2005,11(48):7585–7590.

[34] 刘艳利,党燕娜,段玉兰,等.鸡原代肝细胞培养及叶酸对脂质代谢相关基因表达的影响[J].中国农业科学,2017,50(21):4205–4211.

Isolation and Identification of Duodenal Epithelial Cells of Broiler Embryos *In Vitro* and Its Establishment and Evaluation of Primary Cultured Absorption Model[i]

ZHANG Shumin LIAO Xiudong LYU Lin ZAHNG Liyang LUO Xugang*

(*Mineral Nutrition Research Division*, *Institute of Animal Science*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to evaluate the effect of different inoculation density of duodenal epithelial cells on close connectivity and cell viability, and to choose the best cell inoculation density for building absorption model of primary cultured duodenal epithelial cells of broiler embryos *in vitro*. The experiment was used a single factor complete random design, the duodenal epithelial cells of chick embryos were randomly divided into 3 groups with 6 replicates per group, the inoculation densities were 2.90×10^6 (group Ⅰ), 6.25×10^6 (group Ⅱ) and 8.75×10^6 cells/mL (group Ⅲ), respectively. The experiment lasted for 4 days. The results showed as follows: 1) the isolated duodenal epithelial cells were uniform spherical shape, suspended in the medium. After adhered on the wall, the cells began to spread out and attached uniform and had clear boundaries, showing the growth of "paving stones". 2) Duodenal epithelial cells of the positive experimental group were stained blue-black, and the cells of the negative control group were not colored after alkaline phosphatase staining. 3) The transepithelial electrical resistance (TEER) values of cells in groups Ⅰ and Ⅱ were greater than 300 $\Omega\cdot cm^2$, and the phenol red penetration rate was less than 5% after 24, 48 or 72 h cultivations. The TEER value of cells in group Ⅰ was significantly higher than that in group Ⅱ ($P<0.03$), while the phenol red transmittance rate of cells was significantly lower than that in group Ⅱ ($P<0.03$). 4) The lactate dehydrogenase (LDH) activity of cell culture fluid in group Ⅰ was significantly lower than that in groups Ⅱ and Ⅲ after 24 or 48 h cell cultivations. It is indicated that the cells with inoculation density of 2.90×10^6 cells/mL have clear boundary, strong growth, close linkage and the best viability after 48 h cultivations. Therefore, the absorption model of primary cultured duodenal epithelial cells *in vitro* of broiler embryos is established, which provide a model for studying the absorption and molecular mechanism of phosphorus in primary cultured duodenal epithelial cells.

Key words: duodenal epithelial cells; primary culture; cell isolation; transepithelial electrical resistance

*Corresponding author, professor, E-mail: wlysz@263.net （责任编辑 武海龙）